بررسی شیوع پاپیلوما ویروس انسانی تیپ ۱۶ و ۱۸ و تغییرات بیان پروتئین موتانت P53 در ۵۰ مورد SCC مری

*دکتر محمد رضا عباس زادگان، ** دکتر عباسعلی امیدی،** دکترعباسعلی نیازی،** دکترمحمد رضا زهیدی،
*مهران غلامین، *دکتر خدیجه جامی الاحمدی،** دکترکامران غفار زادگان
*آزمایشگاه ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
**بخش پاتولوژی بیمارستان قائم، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

نواحی جغرافیایی با شیوع بالای سرطان مری به عنوان کمربند سرطان مری شناخته شده است که یك انتهای آن ناحیه شمال ایران و انتهای دیگر آن در شمال چین می باشد. یکی از عوامل متعدد مطرح شده دربروز SCC مری، پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) است. مطالعات متعددی در سراسر دنیا ، به خصوص نواحی با شیوع بالا ، همراهی این ویروس با SCC مری را نشان داده است. این مطالعه در سالهای ۱۳۸۱-۱۳۷۶ ، به منظور بررسی وجود ژنوم HPV در نمونه های SCC مری انجام گرفته است و از آن جا که مکانیسم سرطان زایی HPV از طریق غیر فعال کردن پروتئین Rb و P53 می باشد ، تغییرات همزمان پروتئین P53 نیز مورد مطالعه قرار گرفت تا علاوه بر میزان همراهی HPV با SCC مری ، نقش سببی آن نیز بررسی گردد.

جهت مطالعه ، بلوکهای پارافینی ۵۰ مورد SCC مری از بیمارستان قائم مشهد از سالهای ۱۳۸۱-۱۳۷۶ ، انتخاب گردید که پس از استخراج DNA ، بر روی ۴۵ نمونه قابل بررسی جهت جستجوی ژنوم HPV تیپ ۱۶ و ۱۸ ، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن E7 آزمایش PCR انجام شد. ۸ مورد (۲۰٪) نمونه ها از نظر HPV تیپ ۱۶ مثبت و تمام نمونه ها برای HPV تیپ ۱۸ منفی بودند. بررسی تغییرات بیان پروتئین موتانت P53 با استفاده ازتکنیك ایمونوهیستوشیمی، در ۳۷ مورد (۷۴٪) از ۵۰ مورد مثبت و در ۱۳ مورد (۲۶٪) منفی بود. تمام موارد HPV مثبت از نظر بیان P53 منفی بودند که مطابق با انتظار ما از نحوه سرطان زایی HPV می باشد. با توجه به درصد همراهی به دست آمده، احتمالاً HPV می تواند در بروز SCC مری نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی : P53 , PCR , HPV ,SCC,Esophagous

مقدمه

سرطان مری یکی از شایعترین بدخیمی ها می باشد که از نظر جغرافیایی، در برخی از نقاط دنیا که به کمربند سرطان مری معروف است، شیوع بسیار بالایی دارد. این کمربند از شمال ایران تا شمال چین گسترش دارد(۱۰). مانند دیگر سرطانها، عوامل اتیولوژیك زیادی برای SCC مری ذکرشده است که شامل عادات غذایی، عوامل محیطی مانند آب، برخی مواد معدنی و سابقه برخی بیماریهای مری می باشد (۲۱،۱۶،۱۴،۱۱،۹). یکی از عواملی که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است ویروسهای سرطان زا به خصوص HPV می‌باشد(۱۹،۱۸) که مطالعات زیادی در نقاط مختلف دنیا بر روی آن انجام شده است.

مجموع این مطالعات نشان دهنده شیوع بالای عفونت HPV در مناطق با فراوانی بالای SCC مری و شیوع پائین آن در مناطق با میزان ابتلاء کم می باشد (جدول ۱). در این

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعه ۵۰ مورد SCC مری از نظر میزان عفونت با HPV بررسی گردیده و همچنین تغییرات بیان پروتئین موتانت P53 که در سیر سرطان زایی HPV دارای اهمیت می باشد، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

این مطالعه برروی ۵۰ مورد بلوکهای پارافینی، بیماران مبتلا به سرطان مری که بعد از جراحی به آزمایشگاه آسیب شناسی بیمارستان قائم مشهد ارسال شده بود، انجام گردید.

روش بررسی HPV

استخراج DNA: از بلوکهای پارافینی انتخاب شده در شرایط استریل ۵ برش ۴ الی ۵ میکرونی تهیه و در میکروتیوب قرار گرفت. با استفاده از گزیلول ، پارافین بافتها حذف شد و سپس با استفاده از بافر استخراج حاوی پروتئیناز K ، بافت هضم و DNA استخراج گردید(۱۵).

بررسی قابلیت DNA جهت Amplification: DNA ی استخراج شده ابتدا توسط پرایمرهای اختصاصی ژن بتا گلوبین PCR شد و نمونه هایی که Amplification این ژن را نشان دادند، جهت مطالعه برای HPV انتخاب گردید.

جستجو برای ژن E7 از ژنوم HPV های تیپ ۱۶ و ۱۸ با استفاده از روش PCR: با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی ژن HPV 16 E7 با توالی (F-5′ TGT GTC CTG AAG AAA AGC AAA GAC و R-5′ AGC TGT CAT TTA ATT GCT CAT AAC AGT A) و یک جفت پرایمر اختصاصی ژن E7 با توالی(F-5′CGA ACC ACA ACG R-5′GCT TAC TGC TGG GAT GCA CA،TCA CAC AAT) برای HPV تیپ ۱۸، تست PCR به صورت جداگانه برروی نمونه ها انجام گردید.

شرایط PCR جهت تکثیر قطعات ژنی E7 اززنوم HPV تیپ ۱۶و۱۸به شرح ذیل می باشد:

۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده از بافت به میکروتیوپ حاوی Primer 0.5µmol/l, Taq Pol.0.6U, dNTP 200µM, $MgCl_2$ 1.5Mm افزوده و به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (Perkin Elmer 480) و ۳۵ سیکل در شرایط دمایی ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه ، ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه آزمایش PCR انجام گردید.

اندازه قطعه تکثیر یافته در مورد HPV 16 E7، 224b.p. و در مورد HPV 18 E7، 159b.p. می باشد. پس از انجام PCR ، فرآورده آن در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید بررسی گردید (شکل ۱).

بررسي تغييرات بيان پروتئين P53 به روش ايمونوهيستوشيمي

از ۵۰ مورد بلوك پارافینی انتخاب شده برشهای ۵-۴ میکرون تهیه گردید و با استفاده از کیت های Cell marque و DAKO که حاوی آنتی بادی کلون Do7 می باشد، تحت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای پروتئین موتانت P53 قرار گرفت.

نتایج

از ۵۰ نمونه مورد مطالعه که برای ژن بتاگلوبین توسط تست PCR بررسی گردید، ۴۵ نمونه که از لحاظ کیفی مناسب بود تحت انجام تست PCR برای ژنE7 ژنوم HPV تیپ ۱۶ و ۱۸ با استفاده از پرایمر اختصاصی قرار گرفت. در مورد HPV تیپ ۱۸، هیچ مورد مثبتی پیدا نشد.

ازنظر HPV تیپ ۱۶ ، ۸ نمونه از ۴۵ نمونه (۲۰٪) مثبت بود. نمونه‌های مثبت و منفی HPV تیپ ۱۶ به تفکیک جنسیت در نمودار ۱ ارائه شده است. ارتباط بین نتایج مثبت و منفی HPV تیپ ۱۶ با درجه تمایز تومور مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن به شرح ذیل می باشد:

از ۵۰ نمونه مورد مطالعه ، رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای پروتئین P53 به عمل آمد که ۳۷ نمونه (۷۴٪) مثبت و ۱۳ نمونه (۲۶٪) منفی بود. موارد مثبت و منفی P53 از نظر درجه تمایز تومور مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول شماره ۳ ذکر شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: فراوانی همراهی HPV با SCC مری در مطالعات مختلف

شماره مرجع	منطقه مورد مطالعه	شیوع SCC مری	درصد همراهی با HPV	تعداد نمونه مورد مطالعه
۱	آلاسکا	بالا	۴۵	۲۲
۱۲	چین	بالا	۲۱	۱۵۲
۵	چین	بالا	۱۷	۱۱۷
۱۵	شمال آمریکا	پائین	۲	۵۱
۱۷	اسلوئی	پائین	۰	۱۲۱
۲۰	ژاپن	پائین	۰	۱۰۳

جدول ۲: مقایسه نتایج HPV تیپ ۱۶ با درجه تمایز تومور
(X^2 = ۰/۹٤ ، p = ۰/٦۲ ، df = ۲).

درجه تمایزتومور / HPV تیپ ۱۶	مثبت	منفی
خوب	۳	۸
متوسط	۳	۱۹
ضعیف	۲	۱۰

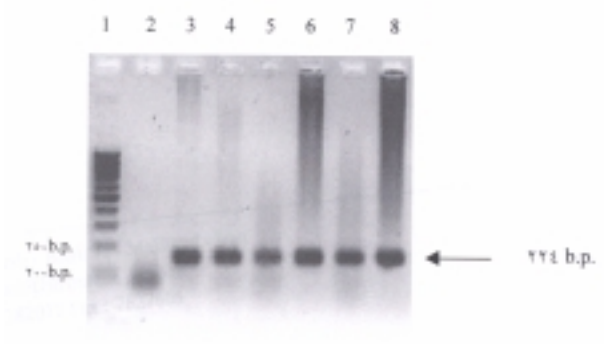
جدول ۳ : مقایسه نتایج ایمونوهیستوشیمی P53 با درجه تمایز تومور)
(X^2 = ۰/۷۱ ، p = ۰/٦۹ ، df = ۲).

درجه تمایزتومور / P53	مثبت	منفی
خوب	۸	۴
متوسط	۱۹	۵
ضعیف	۱۰	۴

جدول ٤: مقایسه نتایج HPV تیپ ۱٦ و P53

P53 / HPV تیپ ۱۶	مثبت	منفی
مثبت	۰	۳۵
منفی	۸	۲

نمودار ۱: نمونه های HPV تیپ ۱٦ مثبت و



شکل ۱: ژل آگاروز ۱/۵ درصد مربوط به تکثیر ژن E7 ویروس HPV تیپ ۱٦

نمونه شماره ۱: استاندارد وزن ملکولی
نمونه شماره ۲ : کنترل منفی
نمونه شماره ۳: کنترل مثبت
نمونه شماره ٤ و۵و٦و۷و۸ : نمونه های مربوط به بلوکهای پارافینی بیماران مبتلا به ESCC.

بحث

در مطالعات مشابه که در نقاط مختلف دنیا از جمله چین(۸،۵،۱۲)، آلاسکا (۱)، شمال آمریکا(۱۵) انجام گرفته است، وجود ژنوم HPV در نسج سرطانی SCC مری در نواحی با شیوع بالای SCC به اثبات رسیده است، درحالیکه در نواحی با شیوع پائین، ژنوم HPV پیدا نگردیده و یا موارد مثبت ناچیز بوده است(۷،۱۷،۲۰).

این مطالعه بر روی بلوکهای پارافینی افراد مبتلا به SCC مری انجام گردید. از ۴۵ نمونه‌ای که برای ژن E7 ویروس HPV تیپ ۱۶ بررسی گردید ، ۸ مورد (۲۰٪) مثبت بوده است که با میزان شیوع HPV در سایر مناطق با خطر بالای SCC مری مطابقت دارد(جدول ۱).

Archive of SID
www.SID.ir

از ۵۰ نمونه مورد مطالعه که با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی P53 رنگ آمیزی گردید ، از نظر تغییرات بیان پروتئین موتانت P53 ۳۷ مورد (۷۴٪) مثبت و ۱۳ مورد (۲۶٪) منفی بود. نتایج مربوط به PCR ژنوم HPV تیپ ۱۶ با نتایج ایمونوهیستوشیمی P53 مقایسه گردید که در جدول ۴ نشان داده شده است.

با توجه به جدول ۴، مشخص می شود که در هیچ موردی HPV وP53 به طور همزمان در یك نمونه مثبت نبوده است و تمام موارد HPV مثبت از نظر P53 منفی هستند، که این نتایج تائید کننده مکانیسم سرطان زایی ویروس HPV می باشد. ویروسهای HPV پرخطر مانند تیپ ۱۶ و ۱۸ ، از طریق پروتئین های E_6و E_7، قادر به ناپایدار کردن سلولها از طریق غیر فعال کردن و تجزیه پروتئینهای Rb وP53 می باشند(۳،۲۰). بنابراین انتظار می رود که درسرطانهایی که HPV در بروز آنها نقش دارد از نظر ایمونوهیستوشیمی پروتئین P53 ، که میزان تجمع پروتئین را بررسی می کند، منفی باشد (۲، ۳، ۴، ۱۳). با توجه به نتایج و بحث فوق می توان برای سرطان زایی HPV در مری، نقش اتیولوژیك احتمالی قائل شد.

موارد مثبت HPV تیپ ۱۶ از نظر شیوع بین زن و مرد مورد بررسی قرارگرفت. از کل نمونه های مورد مطالعه (۲۲ مورد زن ،۲۸ مورد مرد) ۸ نمونه ای که از نظر HPV تیپ ۱۶ مثبت بودند ۶ مورد مرد (۷۵٪) و ۲ مورد زن (۲۵٪) بود. نسبت مرد به زن در جمعیت مورد مطالعه ۱: ۱/۳ بوده است ، در حالیکه نسبت مرد به زن در موارد مثبت HPV تیپ ۱۶ ، ۳:۱ می باشد. نتایج موجود در جدول ۲ نشان می دهد که بین نتایج مربوط به HPV تیپ ۱۶ با درجه تمایز تومور هیچگونه ارتباط آماری معنی داری وجود ندارد. همچنین مطالعات آماری هیچگونه ارتباط معنی داری بین نتایج مربوط به رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی P53 با درجه تمایز تومور (جدول ۳) نشان نمی دهد.

از این مطالعه می توان چنین نتیجه گرفت که در ایران نیز HPV در نمونه های SCC مری وجود داشته و ممکن است به عنوان یك عامل خطر به صورت مستقل ویا به صورت سینرژیسم با عوامل دیگر عمل نماید. همچنین HPV می تواند به عنوان عامل بی ثبات کننده سلول برای دیگر عوامل سرطان زای محیطی نقش داشته باشد.

تقدیر و تشکر

در پایان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به جهت همکاری در اجرای این پروژه ونیزهمکاران محترم بخش ژنتیك انسانی پژوهشکده بوعلی، بخش پاتولوژی بیمارستان قائم (عج) و سرکار خانم قاسمی تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Beth A., Miller, *et al.*, 1997, Human papiloma virus type 16 DNA in esophageal carcinomas from Alaskan natives, lnt. J. Cancer,71: 218-22
2. Colliev L., Balows A., Sussman M., Topley and Wilson's microbial infection, 9th ed. Mosby, USA, 1998, p.373-384
3. Cote R. J., Taylor C. R., in: Anderson's pathology, 10th ed., Mosby, USA, 1996, p.136-175.
4. Cotran R. S., Kumar V., Collins T., Robbins pathologic basis of disease, 6th ed., Saunders, USA, 1999, p.143-171.
5. De-villiers E. M., *et al.*, 1999, An interlaboratory study to determine the presence of human papilloma virus DNA in esophageal carcinoma from china, Int. J. Cancer, 81(2):225-8
6. Denardi F. G., Riddell R. H., in: Histology for pathologists, 2ed ed., Iippincot-Raven Publishers, USA, 1997, p.461-480.
7. Der R., Chandrasoma P., in: Gastrointestinal pathology, Appleton & Lange, USA, 1991, p.43-71.
8. Fleishcher D. E., Haddad N. G., in: The esophagus, 3th ed., Lippincot Williams & Wilkins, USA, 1999, p.235-258.
9. Friesen M., *et al.*, 1987, Substituted hydroxyphenanthrenes in opium pyrolysates implicated in oesophageal cancer in Iran, Carcinogenesis, 8(10): 1423-32.
10. Ggadirian P., An epidemiologic study of esophagial cancer with particular reference to Northen Iran, Ph.D. Thesis, 1982, London University, Institute of Cancer Research, Division of Epidemiology.

Archive of SID
www.SID.ir

11. Ggadirian P., 1987, Food habits of the people of the Caspian Littoral of Iran in relative to esophageal cancer, Nutr. Cancer, 9(2-3): 147-57.
12. He-D, *et al.*, 1997, Prevalence of HPV infection in esophageal SCC in Chines patients and its relationship to the p53 gene mutation, Int. J. Cancer, 72(6): 959-64.
13. Henry J. B., Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 20th ed., Saunders, USA, 2001, p.1287-1298
14. Hormoz Diari H., 1975, Dietary factor and esophageal cancer in the Caspian Littoral of Iran, Cancer Res., 35:3493-8.
15. Jerrold R., Turner, *et al.*, Low Prevalence of human papilloma virus infection in esophageal squamous cell carcinomas from North America
16. ONeill C. M., *et al.*, 1980, A fine fibrous silica contaminant of flour in the high esophageal cancer area of North-East Iran, Int. J. Cancer, 26(5):617-28.
17. Polgak M., *et al.*, 1998, Human papilloma virus infection in esophageal carcinomas, Hum. Pathol., 29(3): 266-71.
18. Rosai J., Ackerman's surgical pathology, 18th ed., Mosby, USA, 1995, p.589-615.
19. Rustgi A. K., in: Textbook of gastroentrology, 3th ed., Lippincot Williams & Wilkins, USA, 1999, p.1278-1295.
20. Saegusa M., *et al.*, 1997, Absence of HPV genomic sequence detected by the PCR in esophageal and gastric carcinoma in Japan, Mol.Pathol., 50(2):101-4.
21. Wang H., *et al.*, 2000, The fumonisin B1 content in corn from North China, high risk area of esophageal cancer, J. Env. Pathol.Toxicol. Oncol.,19(1-2):139-41.

Archive of SID

www.SID.ir